

HPLC를 이용한 製劑中 프레드니솔론의 含量均一性試驗에 관한 研究

金炯局 · 李哲圭 · 高建一 · 金在百

圓光大學校 藥學大學

Determination of Prednisolone in Tablets by High Performance Liquid Chromatography

Hyung Kook Kim, Cheol Kyu Lee, Geun Il Ko, and Jae Back Kim

(Received May 31, 1983)

A convenient high performance liquid chromatographic method for the quantitative determination and content uniformity of prednisolone in tablets is described. The prednisolone was chromatographed using a μ -Bondapak C₁₈ column and the eluent 70% MeOH at a flow rate 1.0ml/min. Diethylstilbestrol was used as an internal standard. The UV detector response at 254nm was linear over a range of 10~60 μ g/ml under conditions of the analysis.

Reproducibility studies gave relative standard deviations of 0.3~0.5%.

프레드니솔론은 류마치性關節炎, 류마치熱 등 各種 膠原病에 사용되며 또 여러가지 副腎皮質機能不全症에 사용된다.

프레드니솔론錠에 대한 定量法으로 USPXX¹⁾의 TLC法을 이용한 single steroid assay와 含量均一性試驗法으로 블루테트라졸롬을 이용하는 assay for steroids法이 있으며 大韓藥典²⁾에 수재된 定量法 및 含量均一性試驗法은 모두 吸光度法이다.

또 HPLC法을 利用하여 Gupta는 液劑中의 프레드니솔론의 定量 및 그 安定性を 시험하였으며³⁾ Tsuji는 HPLC에 의한 여러가지 實驗條件을 提示하고 있다⁴⁾.

USPXX의 경우 TLC法 등에 의한 比色法은 그 操作에 時間이 걸리며 方法의 精度에도 問題點이 있는 反面 大韓藥典의 定量法은 그 操作이나 精度등에는 별 문제가 없으나 含量均一性試驗法에는 多量의 檢體處理가 필요하게 되어 實驗操作에서 實驗室에 크게 부담을 준다.

앞에서 말한 HPLC法도 그대로 프레드니솔론錠의 定量法이나 含量均一性試驗法으로 적용하

는 데에는 그 精度, column의 利用 등에 問題가 있다.

따라서 著者 등은 方法의 簡便性, 迅速性, 精度 등을 고려하여 HPLC法을 利用, 디에칠스틸베스트를 內部標準物質로하여 錠劑中 프레드니솔론을 定量하는 定量法 및 含量均一性試驗法을 확립함과 동시에 이 法을 國內市販品에 적용하여 均一性 등 그 品質을 評價하고자 本 研究를 試圖하였던 바 迅速正確하며 精度가 좋은 方法을 樹立하였고 이를 市販品에 적용하여 良好한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

實驗 方法

材料—錠中 5mg의 프레드니솔론을 함유한 市販品 3種, 프레드니솔론 및 디에칠스틸베스트를 標準品(USP), 메탄올 및 증류수(모두 HPLC用)

裝置 및 實驗條件—Detector: Waters absorbance detector model 440, column: μ -Bondapak C₁₈, wavelength: 254nm, mobile phase: 70% MeOH, sensitivity: 0.1 aufs, flow rate: 1.0ml/min., pressure: 2000 psi, chart speed: 0.25cm/min, injection size: 10ml

定量法—프레드니솔론 標準品을 105°에서 3시간 말리고 그 약 25mg을 정밀하게 달아 50ml의 메스플라스크에 넣고 메탄올을 넣어 녹인 다음 메탄올로 標線까지 채워 섞는다. 이 액 2.0ml를 25ml의 메스플라스크에 取하고 다음의 內部標準液 2.0ml를 넣은 다음 메탄올로 標線까지 채워 섞어 標準液으로 한다.

디에칠스틸베스트를 標準品 約 25mg을 달아 50ml의 메스플라스크에 넣고 메탄올을 넣어 녹인 다음 메탄올로 標線까지 채워 섞어 內部標準液으로 한다.

이 藥 20정을 취하여 그 무게를 정밀하게 달 다음 가루로 한다. 프레드니솔론(C₂₁H₂₈O₅) 약 25mg에 해당하는 약을 정밀하게 달아 50ml의 메스플라스크에 넣고 메탄올 30ml를 넣어 진탕기로 30분간 진탕, 추출한다. 메탄올로 標線까지 채워 섞은 다음 millipore 여지를 써서 여과한다. 처음 여액은 버린다. 이 액 약 2.0ml를 25ml의 메스플라스크에 취하고 여기에 內部標準液 2.0ml를 넣은 다음 메탄올로 標線까지 채워 섞어 檢液으로 한다.

標準液 및 檢液 각 10 μ l씩을 취하여 앞의 實驗條件으로 液體크로마토 그래피를 한 다음 각 액의 프레드니솔론 및 디에칠스틸베스트의 피이크높이를 測定하고 內部標準物質의 피이크높이에 대한 프레드니솔론의 피이크높이의 比 H₅ 및 H₇를 求하여 다음 式에 의해 프레드니솔론의 含量을 計算한다.

$$\text{프레드니솔론(C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{)의 양(mg)} = \text{標準品の 양(mg)} \times \frac{H_7}{H_5}$$

含量均一性試驗—프레드니솔론 標準品을 105°에서 3시간 말리고 그 약 25mg을 정밀하게 달아 50ml의 메스플라스크에 넣고 메탄올을 넣어 녹인 다음 메탄올로 標線까지 채워 섞어 標準液으로 한다.

定量法の 內部標準液을 2→25의 比率로 메탄올로 희석시킨 液을 稀釋內部標準液으로 한다.

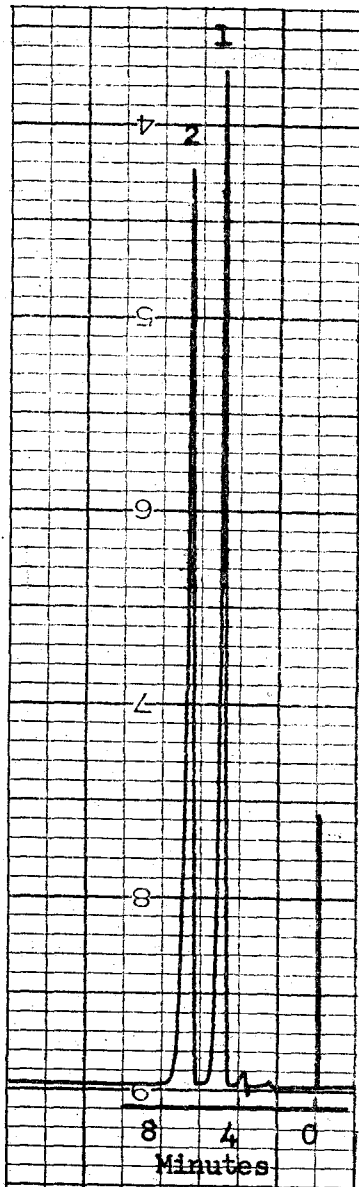


Figure 1-Chromatogram of perdnisolone(1) and diethylstilbestrol(2).

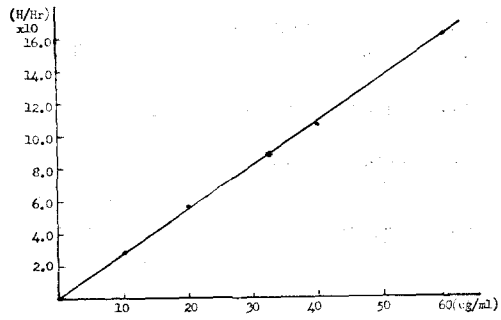


Figure 2-Prednisolone calibration curve.
Key: H, prednisolone height;
Hr, diethylstilbestrol height.

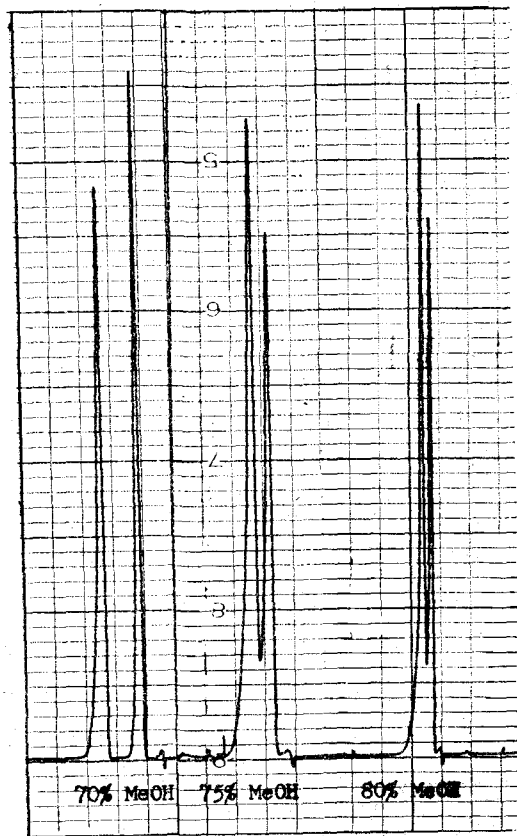


Figure 3-Comparison of resolution by the mobile phase concentration.

Table I—Reproducibility and Precision of HPLC

Run(H/Hr)					Average	Std. Dev.	RSD(%)
1	2	3	4	5			
1.063	1.062	1.067	1.074	1.068	1.067	0.005	0.47

H : Prednisolone height

Hr : Diethylstilbestrol height

Table II—Recovery Data of Prednisolone

Run(%)					Average(%)
1	2	3	4	5	
100.8	100.6	100.5	100.7	100.4	100.6

藥 1錠(錠當 5mg의 프레드니솔론) 썩을 10개의 마개가 있는 시험관에 넣고 유리막대로 가루로 한 다음 메탄올 10.0ml씩을 넣고 마개를 한 다음 진탕기로 30분간 진탕, 추출한다. millipore여지를 써서 여과한 액을 검액으로 한다.

標準液 및 10個의 檢液 2.0ml씩을 11개의 25ml 메스플라스크에 각각 취하고 稀釋內部標準液으로 標線까지 채워 섞은 다음 定量法의 操作에 따라 시험한다.

$$\text{프레드니솔론}(C_{21}H_{28}O_5)\text{의 양}(\%) = C \times \frac{H_T}{H_S} \times \frac{100}{W}$$

C : 標準液의 濃도($\mu\text{g/ml}$)W : 檢液의 濃도($\mu\text{g/ml}$)

實驗結果 및 考察

그림 1은 프레드니솔론 및 內部標準物質인 디에칠스틸베스트롤의 크로마토그램이다. 실험 조건에서 프레드니솔론의 유지시간은 약 5분이며 디에칠스틸베스트롤의 유지시간은 약 7분이다.

檢量線檢討—그림 2는 프레드니솔론 標準原液($500\mu\text{g/ml}$) 0.5ml, 1.0ml, 2.0ml 및 3.0ml를 4개의 25ml 메스플라스크에 취하고 여기에 內部標準液 2.0ml를 넣은 다음 메탄올로 標線까지 채워 섞어 標準液系列을 만든 다음 이 액을 $10\mu\text{l}$ 씩 각각 5회 注入하여 얻은 피이크 높이 비(디에칠스틸베스트롤에 대한 프레드니솔론피이크 높이 비)를 縱軸으로 하고 프레드니솔론의 濃도를 橫軸으로 하여 plot한 것이다. 여기에서 얻은 檢量線은 原點을 通過하는 直線으로 $10\sim 60\mu\text{g/ml}$ 범위안에서 實驗條件에서 定量性이 있음을 알 수 있다.

再顯性檢討—Table I은 定量條件에서 標準液을 10ml씩 5회 注入하여 얻은 內部標準物質의 피이크높이에 대한 프레드니솔론의 피이크높이의 비를 나타낸 것이다. 相對標準偏差가 0.47%로 재현성이 좋음을 알 수 있다.

實驗全體를 통해서 본 相對標準偏差는 0.28부터 0.47%이다.

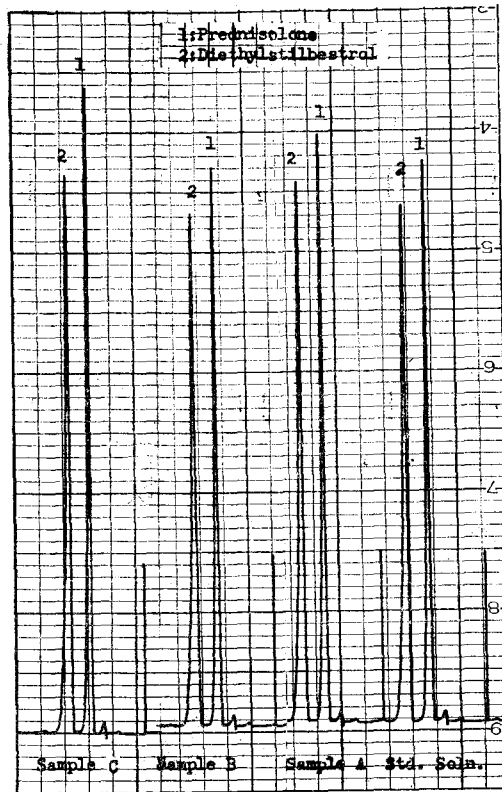


Figure 4-Chromatogram of 3 marketed samples.

Table III—Assay of 3 Branded Tablets

Sample	Run(%)					Average	STD	RSD
	1	2	3	4	5			
A	100.1	99.6	99.7	100.7	99.6	99.9	0.45	0.45
B	99.5	100.0	99.5	99.3	98.8	99.4	0.28	0.28
C	106.2	105.9	105.7	105.6	105.7	105.8	0.36	0.34

回收率檢討— Table II는 유당 500mg에 스테르니솔론 25mg을 添加한 다음 定量法에 따라 시험하여 얻은 結果이다. 회수율은 100.6%로 精確성이 있음을 알 수 있다.

內部標準物質의 檢討—이 報文에서는 여러가지의 內部標準物質에 대한 檢討는 시도하지 않았지만 디에칠스틸베스트롤은 內部標準物質로 사용하였던 바 재현정도 좋을 뿐만 아니라 比較的 짧은 維持時間에다 移動相의 농도를 調節하여 維持時間을 적절하게 調整할 수 있어 量均一性試驗 등 大量檢體處理時 分析時間을 短縮시킬 수 있을 것으로 思料된다.

移動相檢討—그림 3은 同一 實驗條件에서 移動相인 methanol의 농도만을 바꾸어 시도한 크로마토그램이다.

Methanol의 농도가 작아질 수록 分離能이 좋아지는 것을 볼 수 있다. 그러나 分離度만을

Table IV—Results of 30 Individual Tablet Assays (Content Uniformity of Prednisolone)

Sample	Assay(%)					X	RSD	Assay*
A	104.3	102.3	99.2	97.3	101.2	101.2	2.6	99.9
	99.1	104.3	104.2	102.3	98.1			
B	97.6	96.5	102.5	101.2	99.6	99.4	2.8	99.4
	101.6	95.1	100.0	97.2	102.9			
C	107.5	100.0	108.3	110.8*	102.5	106.2	3.0	105.8
	109.6	105.1	107.5	106.0	104.8			

위주로 할 때에는 維持時間이 길어져 分析時間이 많이 所要되는 短點이 생기게 된다.

本試驗에서는 methanol(HPLC用)의 농도를 70%로 하여 사용했다.

市販品에 대한 應用—그림 4는 市販品에 대하여 定量法에 따라 시험하여 얻은 크로마토그램이다.

檢體 C의 内部標準物質의 피이크높이에 대한 프레드니솔론의 피이크높이의 比는 標準液에 대해서는 물론 검체 A 및 B에 대하여서도 큰 것을 視覺적으로 알 수 있다. 그 分析結果는 Table III에서와 같다. A 및 B 두 제품은 表記量에 대하여 거의 100%에 해당하는 量을 함유하고 있는 反面 C는 約 5%가 많은 105.8%를 함유하고 있다.

또 이 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 검체의 크로마토그램은 標準液의 것과 똑 같은 모양으로 부형제 등에 의한 妨害없이 定量될 수 있음을 알 수 있다.

含量均一性試驗檢討—Table IV는 定量法에서 사용한 同一한 檢體 A, B 및 C에 대한 含量均一성을 含量均一試驗法에 따라 시험한 結果이다. A, B 및 C의 總平均値는 각각 101.2% 99.4%, 106.2%로 定量法에 의한 값과 거의 一致한다. 錠劑間의 含量均一성은 그 相對標準偏差가 2.6, 2.8 및 3.0으로 매우 良好하며 이 값은 會社間의 均一性 역시 좋음을 보여주고 있다.

個個測定値는 3個製品 모두 含量均一性試驗基準인 85.0~115.0%(平均値에 대하여)에 충분히 들어간다.

이 Table에 의하면 시험한 30錠 모두가 85.0~115.0%에는 충분히 다 들어감은 물론 C제품의 110.8%하나를 除外한 29錠 하나하나 모두가 錠劑의 含量規定인 90.0~110.0%에도 들어가 國內製藥會社가 表記量에 가까운 그러면서도 均一성이 좋은 製品을 生産해낼 수 있다는 것을 의미하며 HPLC法을 公定方法으로 採擇하는 경우 含量規定에 대한 보다 엄격한 規格가 능성을 示唆해준다.

예를 들면 현재의 90.0~110.0%를 93.0~97.0% 또는 95.0~105.0 등으로 보다 엄격하게 하여 보다 正確한 藥用量的 投與를 가능케 할 수 있을 것으로 思料된다.

結 論

① 디에칠스틸베스테롤을 內部標準物質로 利用하여 프레드솔론錠중 프레드니솔론을 定量하는 이 方法은 그 正確性은 물론 精度가 좋으며 操作도 간편하여 公定書方法으로의 活用은 물론 非公定書方法으로 크게 利用될 것이 期待되며 特히 이 方法에 의한 含量均一性試驗法은 그 操作의 간편성으로 含量均一性試驗에 따른 實驗室의 부담을 크게 경감시켜준다

② 實驗材料가 3個會社製品에 限定되긴 했지만 適用結果 錠劑間의 均一性은 勿論 會社間의 均一性도 良好하였다.

③ 이 方法을 公定方法으로 採擇하는 경우 現行 含量規定에 대한 보다 엄격한 규제가능성을 示唆해준다.

文 獻

- 1) The United States Pharmacopeia XX rev. 1980. p.651.
- 2) 大韓藥典 제 4 개정, 1982. p.722.
- 3) V. Das Gupta, *J. Pharm. Soc.*, **68**, 908(1979)
- 4) Kiyoshi Tsuji, *GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents*, part 2, Marcel Dekker Inc., 795, 895, 896, 901~904(1978)